

Rec'd PCT/PTO 11 JUL 2005

JP2004/000131

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

09.1.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 0 9 6 0 4 6
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 6 0 4 6]

出 願 人
Applicant(s): 香川大学長

REC'D 27 FEB 2004

WIPO

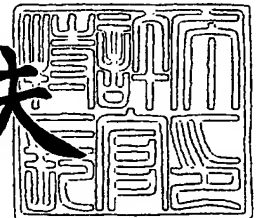
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 2 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 9 0 2 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 IT-P15-06

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C07H 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県木田郡三木町池戸 2 3 9 3 香川大学農学部内

 【氏名】 何森 健

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県木田郡三木町池戸 2 3 9 3 香川大学農学部内

 【氏名】 高田 悟郎

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県木田郡三木町池戸 1 7 5 0 - 1 香川医科大学内

 【氏名】 徳田 雅明

【特許出願人】

 【識別番号】 598112280

 【氏名又は名称】 香川大学長

【代理人】

 【識別番号】 100102314

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 須藤 阿佐子

 【電話番号】 042-388-1516

【代理人】

 【識別番号】 100123984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 須藤 晃伸

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子配列とその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、L-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA。

【請求項3】 請求項2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 Pseudomonas stutzeri 由来のL-ラムノースイソメラーゼである請求項1、2または3のDNA。

【請求項5】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項6】 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項7】 請求項5又は6記載のタンパク質と、翻訳開始コドンタンパク質とを結合させた融合タンパク質。

【請求項8】 請求項1～3のいずれか記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項9】 請求項4又は5記載のタンパク質を発現することができる発現系を含んでいる宿主細胞。

【請求項10】 請求項9の発現系を含んでなる宿主細胞を培地に培養し、得られる培養物からL-ラムノースイソメラーゼ活性を有する組換えタンパク質を採取することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業の属する技術分野】

本発明は Pseudomonas stutzeri の生産するL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列をあきらかにしたものである。

L-ラムノースイソメラーゼは各種の微生物から単離され、それをコードする遺伝子の配列も報告されている。本発明は、土壌より分離したバクテリア (Pseudomonas stutzeri) のL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列を決定したところ、これまで報告されている遺伝子配列との相同性のないもので、遺伝子的にも、蛋白質的に新規なものであることが明らかとなったものである。

この配列を利用することで、遺伝子操作を利用した希少糖に生産や各種遺伝子工学的手法を用いた用途に利用できるものである。

【0002】

【従来の技術】

Pseudomonas stutzerii LL172aの生産するL-ラムノースイソメラーゼは、非特許文献1で発表された公知酵素である。L-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化を触媒する酵素である。

Pseudomonas stutzerii LL172aの生産するL-ラムノースイソメラーゼは、D-アロースとD-プシコースの間の異性化にも作用することが既知であり、D-プシコースからD-アロースを生産することができる酵素である。

異性化酵素はもっとも高い活性を示す基質を元に命名されるため、L-ラムノースイソメラーゼと同一で命名された酵素は、大腸菌および枯草菌から単離され、それをコードする遺伝子の配列が報告されている。

【0003】

【非特許文献1】

「ジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering)」第85巻、539乃至541頁 (1998年)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、新規かつ有用なL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子の配列を提供し、遺伝子操作を利用した希少糖に生産や各種遺伝子工学的手法を用いた用途に利用できるようにするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は Pseudomonas stutzeri の生産するL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列を明らかにしたものである。L-ラムノースイソメラーゼは各種の微生物から単離され、それをコードする遺伝子の配列も報告されている。しかし、これらの起源由来のL-ラムノースイソメラーゼがD-プシコースに反応してD-アロースを作るという報告はない。

本発明は、土壌より分離したバクテリア (Pseudomonas stutzeri LL172a) のL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列を決定したところ、これまで報告されている遺伝子配列との相同性のないもので、遺伝子的にも、蛋白質的に新規なものであることが明らかとなったものである。

この配列を利用することで、遺伝子操作を利用した希少糖に生産や各種遺伝子工学的手法を用いた用途に利用できるものである。

【0006】

L-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化反応を触媒するPseudomonas stutzeri 由来のL-ラムノースイソメラーゼをコードするDNAと、該DNAを用いる組換えDNA技術によるポリペプチドの製造方法を提供することにより解決する。

【0007】

すなわち、本発明は、以下のDNAを要旨とする。

(1)以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質

(2)配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列

の一部若しくは全部を含む配列からなるDNA。

(3) 上記(2)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(4) Pseudomonas stutzerii 由来のL-ラムノースイソメラーゼである上記(1)、(2)または(3)のDNA。

【0008】

また、本発明は、以下のタンパク質を要旨とする。

(5) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(6) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

(7) 上記(5)又は(6)のタンパク質と、翻訳開始コドンタンパク質とを結合させた融合タンパク質。

【0009】

また、本発明は、上記(1)～(3)のいずれか記載のDNAを含む組換えベクターを要旨とする。

また、本発明は、上記(4)又は(5)のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞を要旨とする。

さらにまた、本発明は、上記の発現系を含んでなる宿主細胞を培地に培養し、得られる培養物からL-ラムノースイソメラーゼ活性を有する組換えタンパク質を採取することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法を要旨とする。

【0010】

【発明の実施の形態】

Pseudomonas stutzerii に属する菌株「Pseudomonas stutzerii LL172a」は、上記文献に記載された公知菌であり、香川大学農学部生物資源食糧化学科 何森健研究室に保存されているに保存されている。

L-ラムノースイソメラーゼは、L-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化を触媒する酵素である。Pseudomonas stutzerii LL172aの生産するL-ラムノースイソメラーゼは、D-

アロースとD-プシコースの間の異性化にも作用するので、D-プシコースからD-アロースを生産することができる酵素である。ただし、D-プシコースからD-アロースを生産するためには、Pseudomonas stutzerii LL172a由来の酵素が必要である。

Pseudomonas stutzerii LL172a由来のL-ラムノースイソメラーゼをコードする遺伝子配列は、これまで報告されているL-ラムノースイソメラーゼの遺伝子配列との相同性のないもので、遺伝子的にも、蛋白質的に新規なものであることが明らかとなったものである。

【0011】

本発明でいうL-ラムノースイソメラーゼは、Pseudomonas stutzerii LL172a由来のL-ラムノースイソメラーゼであって、配列番号1に記載されるアミノ酸配列、又はそのアミノ酸配列の中の1個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換され、欠失され、1個以上のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有する。本発明でいう遺伝子（DNA）は、上記のL-ラムノースイソメラーゼをコードする塩基配列を有する。

【0012】

すなわち、本発明の対象となるタンパク質としては、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（L-ラムノースイソメラーゼ）や、該配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質を挙げることができる。

また、上記L-ラムノースイソメラーゼ活性としては、好ましくはL-ラムノースからL-ラムニュロースへの異性化反応ならびにL-ラムニュロースからL-ラムノースへの異性化を触媒する酵素活性を挙げることができる。また、D-アロースとD-プシコースの間の異性化を触媒する酵素活性を挙げることができる。D-アロースをD-プシコースから生産できる活性は、Pseudomonas stutzerii LL172a由来のL-ラムノースイソメラーゼ以外には報告されていない。

【0013】

本発明の対象となるDNAとしては、配列番号2に示されるアミノ酸配列からな

るタンパク質や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNAや、かかるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを好ましいものとして例示することができる。

【0014】

これらDNAは、そのDNA配列情報等に基づき、遺伝子ライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。また、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、各種細胞由来のDNAライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、L-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。かかるDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、種々の要素を適宜組み合わせて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0015】

本発明の融合タンパク質としては、上記本発明のタンパク質と翻訳コドンタンパク質とが結合しているものであればどのようなものでもよく、翻訳コドンタンパク質としては、従来知られている翻訳コドンタンパク質であれば特に制限されるものではない。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0016】

本発明はまた、上記本発明のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる本発明のタンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986) 及び Sambrookら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞等を挙げることができる。

【0017】

また、発現系としては、上記本発明のタンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0018】

上記発現系を含んでなる宿主細胞を培養して得られる本発明のタンパク質は、D-アロースの生産に用いることができる。また、かかる本発明のタンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。

【0019】

【実施例】

本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【0020】

実施例 1

L-ラムノースを大量に生産する方法の一つとして、遺伝子工学的手法での増産が考えられる。そこで従来の方法で本酵素をコードする遺伝子をクローン化し遺伝子配列およびアミノ酸配列を決定した。その結果が以下のとおりであった。

[配列決定]

Pseudomonas stutzerii LL172a 由来L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子は、配列表 1 および図 1 に示すとおり、ORF1, 290-bp からなり 430 アミノ酸をコードする新規のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子である。配列表 2 のアミノ酸配列からの計算分子量は 46,946 とオーセンティックの酵素の分子量約 43,000 よりやや大きいものであった。

本遺伝子を大腸菌で組換え発現させると本酵素を活性発現し分子量も約 43,000 と一致した。

【0021】

大腸菌に入れた実験の場合の酵素発現の結果は以下のとおりである。

従って配列表 1 および図 1 に示した遺伝子配列は、L-ラムノースイソメラーゼのものであると確認された。

[本遺伝子配列の特徴]

L-ラムノースイソメラーゼの遺伝子はすでに大腸菌と枯草菌で構造が解析されているが、Pseudomonas stutzerii LL172a 菌由来のL-ラムノースイソメラーゼとのアミノ酸配列の相同性は図 2 に示すとおり 20% 以下と低く、触媒部位も一致しないので同一の酵素ではないと断定した。

すなわちこれまで発表されているL-ラムノースイソメラーゼとは全く新しい遺伝子配列をもつ酵素であった。

アミノ酸配列の相同性をデータベースで用いて解析すると、図 3 に示すとおり、未同定の推定イソメラーゼと 40% 程度の高い相同性を示すが、これらの菌の遺伝子はゲノムプロジェクトによりシーケンスされた結果であり、酵素としては

同定されていない。

以上の結果から、本菌由来のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子は、新規の酵素をコードする遺伝子であると断定することができた。

【0022】

[用途]

遺伝子配列は明確になったことで、この遺伝子配列を利用した分子生物学的手法による各種の実験が可能となる。

例えば、この遺伝子は大腸菌に形質転換し、大量に生産することが可能である。その他この遺伝子にさらに何か新たな遺伝子を結合させるなどして、新しい性質を持つ酵素を生産することが可能となる。

【0023】

実施例 2

<L-ラムノースイソメラーゼをコードするDNA>

1 L-ラムノースイソメラーゼの精製と部分アミノ酸配列の決定

Pseudomonas stutzeri LL172a をトリプティックソイブロス培地で30℃2日間培養しポリエチレングリコール分画、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製後電気泳動で分子量と純度を確認する。分子量は約42,000に単一のバンドとして得られる。臭化シアンを用いて酵素を部分分解しN末端および4箇所の部分アミノ酸アミノ酸配列を決定した。

【0024】

2 プローブの合成と染色体マッピング

上記の培地で培養後、定法に従いCTABを用いて染色体DNAを抽出する。部分アミノ酸配列を元にミックスプライマーを合成し組み合わせを変えて2回のPCRにより特異的に増幅されるPCR産物を得てプローブに用いる。プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行いL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子の染色体上の位置を決定した。

【0025】

3 ゲノムライブラリーのスクリーニング

染色体マッピングにより制限酵素ApaIとSacIで消化した約4.6kbの断片に遺伝

子が含まれていることが分かったのでクローニングベクターpBluescriptIISK+に連結しゲノムライブラリを構築してプローブを用いてスクリーニングした。

【0026】

4 L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子の解析

L-ラムノースイソメラーゼ遺伝子は配列表1および図1に示すとおりORF 1, 290-bpからなり430アミノ酸（配列表2）をコードする新規のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子である。アミノ酸配列からの計算分子量は46,946とC末端側に修飾を受ける元菌の酵素の分子量約42,000よりやや大きい。L-ラムノースイソメラーゼの遺伝子はすでに大腸菌と枯草菌で構造が解析されているが、本菌由来のL-ラムノースイソメラーゼとのアミノ酸配列の相同性は図2に示すとおり20%以下と低く、触媒部位も一致しないので同一の酵素ではないと断定した。また、大腸菌のL-ラムノースイソメラーゼと放線菌のキシロースイソメラーゼで保存されている異性化酵素のコンセンサスアミノ酸残基9箇所のうち5箇所は保存されているがMn結合や基質結合部位は保存されていない。アミノ酸配列の相同性をデータベースで用いて解析すると図3に示すとおり未同定の推定イソメラーゼと40%程度の高い相同性を示すが、これらの菌の遺伝子はゲノムプロジェクトによりシーケンスされた結果であり、酵素としては同定されていない。

以上の結果から本菌由来のL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子は新規の酵素をコードする遺伝子であると断定した。

【0027】

5 組換えL-ラムノースイソメラーゼの活性発現

L-ラムノースイソメラーゼの翻訳開始コドンと高発現ベクターpQE60の翻訳開始コドンを一一致させるようプライマーを設計しPCRで増幅させたL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子をpQE60に組み込んで大腸菌JM109を形質転換し組換え大腸菌を作成した。組換え大腸菌は通常培地で37℃一晚培養するとL-ラムノースイソメラーゼを活性発現しN末端アミノ酸配列、分子量、および、酵素学的諸性質は元菌由来の酵素と一致、酵素生産量は10倍以上上昇し高発現が可能となった。

【0028】

【発明の効果】

L-ラムノースイソメラーゼを遺伝子工学的手法によって、大量に生産することが可能となり、本酵素を用いたD-アロースを含む各種の希少糖の大量生産法を確立できる。

【 0 0 2 9 】

【配列表】

<110> President of Kagawa University

<120> DNA sequence of L-rhamnose isomerase and its usage

<160> 2

<210> 1

<211> 1290

<212> DNA

<213> Pseudomonas stutzerii

<400> 1

ATG GCT GAA TTC AGG ATC GCT CAG GAT GTC GTT GCG CGG GAA AAC GAC AGG

CGC GCC TCG GCG CTG AAG GAA GAC TAC GAG GCG CTC GGC GCG AAT CTC GCC

60

CGC CGT GGC GTC GAC ATC GAG GCC GTC ACG GCC AAG GTC GAA AAG TTC TTC

120

GTC GCC GTC CCC TCC TGG GGC GTC GGC ACG GGC GGC ACG CGC TTT GCG CGC

180

TTC CCC GGC ACC GGC GAG CCG CGC GGC ATC TTC GAC AAG CTG GAC GAC TGC

240

GCC GTC ATC CAG CAG CTG ACA CGC GCC ACG CCC AAT GTC TCG CTG CAT ATT

300

CCG TGG GAC AAG GCC GAT CCG AAG GAG CTG AAG GCC AGG GGC GAC GCC CTC

GGC CTC GGC TTC GAC GCG ATG AAC TCC AAT ACC TTC TCC GAT GCG CCC GGC

360

CAG GCG CAT TCC TAC AAA TAC GGC TCG CTC AGC CAC ACG GAT GCG GCA ACG

420

CGC GCC CAG GCG GTC GAG CAC AAT CTG GAA TGC ATC GAG ATC GGC AAG GCC

480

ATC GGC TCC AAG GCG CTG ACG GTC TGG ATC GGT GAC GGC TCC AAC TTC CCC

540

GGC CAG AGT AAC TTC ACC AGG GCT TTC GAA CGT TAT CTC TCG GCG ATG GCG

600

GAG ATC TAC AAG GGC CTG CCG GAT GAC TGG AAG CTG TTC TCC GAG CAC AAG

660

ATG TAC GAG CCG GCC TTC TAT TCG ACC GTC GTG CAG GAC TGG GGC ACG AAT

TAT CTC ATC GCC CAG ACG CTC GGC CCC AAG GCC CAG TGC CTC GTC GAT CTC

720

GGC CAT CAC GCG CCG AAC ACC AAT ATC GAG ATG ATC GTC GCC CGG CTC ATC

780

CAG TTC GGC AAG CTC GGC GGC TTC CAT TTC AAC GAT TCC AAA TAC GGC GAC

840

GAC GAC CTC GAT GCC GGC GCC ATC GAG CCC TAT CGC CTC TTC CTC GTC TTC

900

AAC GAG CTG GTG GAT GCG GAG GCG CGC GGC GTC AAG GGC TTC CAC CCG GCC

960

CAC ATG ATC GAC CAG TCG CAC AAC GTC ACC GAC CCG ATC GAG AGC CTG ATC

1020

AAC AGC GCG AAC GAA ATC CGT CGC GCC TAT GCG CAG GCC CTC CTT GTC GAC

CGC GCG GCG CTT TCC GGC TAC CAG GAG GAC AAC GAC GCC CTG ATG GCG ACG

1080

GAA ACG TTG AAG CGC GCC TAC CGT ACC GAT GTG GAG CCG ATC CTC GCC GAG

1140

GCC CGC CGC CGC ACG GGC GGC GCC GTC GAC CCC GTC GCG ACC TAT CGG GCC

1200

AGC GGC TAC CGC GCC AGG GTC GCC GCC GAG CGC CCC GCC TCC GTC GCG GGT

1260

GGC GGC GGC ATC ATC

1290

<210> 2

<211> 430

<212> PRT

<213> Pseudomonas stutzerii

<400> 2

Met Ala Glu Phe Arg Ile Ala Gln Asp Val Val Ala Arg Glu Asn Asp Arg Arg

1

5

10

15

Ala Ser Ala Leu Lys Glu Asp Tyr Glu Ala Leu Gly Ala Asn Leu Ala Arg Arg

20

25

30

35

Gly Val Asp Ile Glu Ala Val Thr Ala Lys Val Glu Lys Phe Phe Val Ala Val

40

45

50

Pro Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Gly Thr Arg Phe Ala Arg Phe Pro Gly Thr

55

60

65

70

Gly Glu Pro Arg Gly Ile Phe Asp Lys Leu Asp Asp Cys Ala Val Ile Gln Gln

75

80

85

90

Leu Thr Arg Ala Thr Pro Asn Val Ser Leu His Ile Pro Trp Asp Lys Ala Asp

95

100

105

Pro Lys Glu Leu Lys Ala Arg Gly Asp Ala Leu Gly Leu Gly Phe Asp Ala Met

110

115

120

125

Asn Ser Asn Thr Phe Ser Asp Ala Pro Gly Gln Ala His Ser Tyr Lys Tyr Gly
 130 135 140
 Ser Leu Ser His Thr Asp Ala Ala Thr Arg Ala Gln Ala Val Glu His Asn Leu
 145 150 155 160
 Glu Cys Ile Glu Ile Gly Lys Ala Ile Gly Ser Lys Ala Leu Thr Val Trp Ile
 165 170 175 180
 Gly Asp Gly Ser Asn Phe Pro Gly Gln Ser Asn Phe Thr Arg Ala Phe Glu Arg
 185 190 195
 Tyr Leu Ser Ala Met Ala Glu Ile Tyr Lys Gly Leu Pro Asp Asp Trp Lys Leu
 200 205 210 215
 Phe Ser Glu His Lys Met Tyr Glu Pro Ala Phe Tyr Ser Thr Val Val Gln Asp
 220 225 230
 Trp Gly Thr Asn Tyr Leu Ile Ala Gln Thr Leu Gly Pro Lys Ala Gln Cys Leu
 235 240 245 250
 Val Asp Leu Gly His His Ala Pro Asn Thr Asn Ile Glu Met Ile Val Ala Arg
 255 260 265 270
 Leu Ile Gln Phe Gly Lys Leu Gly Gly Phe His Phe Asn Asp Ser Lys Tyr Gly
 275 280 285
 Asp Asp Asp Leu Asp Ala Gly Ala Ile Glu Pro Tyr Arg Leu Phe Leu Val Phe
 290 295 300 305
 Asn Glu Leu Val Asp Ala Glu Ala Arg Gly Val Lys Gly Phe His Pro Ala His
 310 315 320
 Met Ile Asp Gln Ser His Asn Val Thr Asp Pro Ile Glu Ser Leu Ile Asn Ser
 325 330 335 340
 Ala Asn Glu Ile Arg Arg Ala Tyr Ala Gln Ala Leu Leu Val Asp Arg Ala Ala
 345 350 355 360
 Leu Ser Gly Tyr Gln Glu Asp Asn Asp Ala Leu Met Ala Thr Glu Thr Leu Lys
 365 370 375
 Arg Ala Tyr Arg Thr Asp Val Glu Pro Ile Leu Ala Glu Ala Arg Arg Arg Thr

380 385 390 395
Gly Gly Ala Val Asp Pro Val Ala Thr Tyr Arg Ala Ser Gly Tyr Arg Ala Arg
400 405 410
Val Ala Ala Glu Arg Pro Ala Ser Val Ala Gly Gly Gly Gly Ile Ile
415 420 425 430

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

本発明のPseudomonas stutzerii LL172a 由来のL-ラムノースイソメラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子（DNA）の塩基配列とアミノ酸配列を示す図面である。

【図 2】

本発明のPseudomonas stutzerii LL172a 菌由来のL-ラムノースイソメラーゼと公知のBacillus subtilis 由来のL-ラムノースイソメラーゼのアミノ酸配列を比較する図面である。

【図 3】

本発明のPseudomonas stutzerii LL172a 菌由来のL-ラムノースイソメラーゼと公知のStreptomyces coelicolorまたはThermotoga maritima由来の未同定の推定イソメラーゼの相同性を説明する図面である。

【書類名】 図面

【図 1】

1 ATGGCTGAATTCAGGATCGCTCAGGATGTCGTTGCGGGGAAAACGACAGGCGCGCTCG 60
1 M A E F R I A Q D V V A R E N D R R A S 20
61 GCGCTGAAGGAAGACTACGAGGCGCTCGGCGCGAATCTCGCCGCGCTGGCGTCGACATC 120
21 A L K E D Y E A L G A N L A R R G V D I 40
121 GAGGCGCTCAGGCGCAAGGTCGAAAAGTTCTTCGTCGCGCTCCCTCCTGGGGCGTCGGC 180
41 E A V T A K V E K F F V A V P S W G V G 60
181 ACGGGCGGACGCGCTTTGCGCGCTTCCCGGACCGGCGAGCGCGCGGCATCTTCGAC 240
61 T G G T R F A R F P G T G E P R G I F D 80
241 AAGCTGGACGACTGCGCGCTCATCCAGCAGCTGACACGCGCCACGCCAATGTCGCTG 300
81 K L D D C A V I Q Q L T R A T P N V S L 100
301 CATATTCGCTGGGACAAGGCGGATCCGAAGGAGCTGAAGGCCAGGGGCGACGCCCTCGGC 360
101 H I P W D K A D P K E L K A R G D A L G 120
361 CTCGGCTTCGACGCGATGAACCTCAATACCTTCTCCGATGCGCCCGGCCAGGCGCATTCC 420
121 L G F D A M N S N T F S D A P G Q A H S 140
421 TACAAATACGGCTCGCTCAGCCACACGGATGCGGCAACGCGCGCCAGGCGGTCGAGCAC 480
141 Y K Y G S L S H T D A A T R A Q A V E H 160
481 AATCTGGAATGCATCGAGATCGGCAAGGCCATCGGCTCCAAGGCGCTGACGCTCTGGATC 540
161 N L E C I E I G K A I G S K A L T V W I 180
541 GGTGACGGCTCCAACCTCCCGGCCAGAGTAACCTCACCAGGGCTTTCGAACGTTATCTC 600
181 G D G S N F P G Q S N F T R A F E R Y L 200
601 TCGGCGATGGCGGAGATCTACAAGGGCGTCCCGGATGACTGGAAGCTGTTCTCCGAGCAC 660
201 S A M A E I Y K G L P D D W K L F S E H 220
661 AAGATGTACGAGCGGCGCTTCTATTGACCGCTCGTGACGAGTGGGGCAGCAATTATCTC 720
221 K M Y E P A F Y S T V V Q D W G T N Y L 240
721 ATCGCCAGACGCTCGGCCCCAAGGCCAGTGCTCGTCGATCTCGGCCATCAGCGCGCG 780
241 I A Q T L G P K A Q C L V D L G H H A P 260
781 AACACCAATATCGAGATGATCGTCCCGGCTCATCCAGTTCGGCAAGCTCGGCGGCTTC 840
261 N T N I E M I V A R L I Q F G K L G G F 280
841 CATTCAACGATTCCAATACGGCGACGACCTCGATGCCGGCGCATCGAGCCCTAT 900
281 H F N D S K Y G D D D L D A G A I E P Y 300
901 CGCCTCTTCTCGTCTTCAACGAGCTGGTGGATGCGGAGGCGCGGCGTCAAGGGCTTC 960
301 R L F L V F N E L V D A E A R G V K G F 320
961 CACCGGGCCACATGATCGACGAGTGCACAAACGTACCGACCGGATCGAGAGCCTGATC 1020
321 H P A H M D Q S H N V T D P I E S L I 340
1021 AACAGCGCAACGAAATCCGTGCGCGCTATGCGCAGGCCCTCCTTGTGACCGCGCGGCG 1080
341 N S A N E I R R A Y A Q A L L V D R A A 360
1081 CTTTCGGCTACCAGGAGGACAACGACGCCCTGATGGCGACGAAACGTTGAAGCGCGCC 1140
361 L S G Y Q E D N D A L M A T F E T L K R A 380
1141 TACCGTACCGATGTGGAGCGGATCCTCGCGAGGCCGCGCGCGCACGGGCGGCGCGCTC 1200
381 Y R T D V E P I L A E A R R R T G G A V 400
1201 GACCCGCTGCGGACCTATCGGGCAGCGGCTACCGCGCAGGGTGGCGCGGAGCGCCCC 1260
401 D P V A T Y R A S G Y R A R V A A E R P 420
1261 GCCTCCGTGCGGGTGGCGGCGGCATCATCTGA 1293
421 A S V A G G G G I I * 431

【図 2】

M---AEFR I AQDVVARENDRRASAL KEDYEALGANLARRGVD TEAVTAKVEKFFVA--VP 55
 MT IKANYDSAKQAYEKWG IDVEEALRQLEQVP I SIHCWQGGDI EGFEVNGELSGGIDVT 60

 SWGVGTGGTRFARFPGTGEPRI FDKLDDCAVI QQLTRATPNVSLH IPWDKADPKELKAR 115
 GNYPGKAQTPEELRRDLEKALSL IPGKHRVNLHAI YAE TNREAVERDELKPQHFNWVKW 120

 GDALGLGGFDAMNSNTFSDAPGQAHSYKYGSLSHTDAATRAQAVEHNLECIETGKAIGSKA 175
 AKNLGLGLDFNPTLFSHEKAADGLT-----LSHPDPDI REFWIRHCIAQRRI GEYFGKEL 175

 LTVWIGDGSNFPQGSNFR----AFERYLSAMAEIY-KGLPDDWKUFS-EHKMYEPAFYS 229
 GTPCLTNIWIPDQYKDIPSDRLTPRKRLKESLDRI FSEEISEQHNLDSIESKLFGLGSES 235

 TVVQDWGTNYL I AQTEGPKAQGLVDLGH-HAPNTN I EMIVARE I QFGKLGGFHFND SKYG 288
 YVV--GSHEFYLAYAL TNHKLCLDTGHFHPTETVSNKISSMLLYTDKLA-LHVS RPVRW 292

 DDDLDAGAI EPYRLFLVFNELVDAEARGVKGFHPAHMIDQSHNVTDPIESLINSANEIRR 348
 DSDHVVVLDEL R-----EIALEIVRNHALEKVAIGLDFFDASINRVAAWTIGTRNMIK 346

 AYAQALLVDRAALSGYQEDNDALMATETLKRAYRTDVEPI LAEARRRTGGAYDPVATYRA 408
 ALLYALLPNGYLKQLQEEGRYTERLALMEEFKTYPGA I WDSYCEQMGVPVKEAWLYDI 406

 SGYRARVAAERPASVAGGGG I 430
 KEYEQVLLKRRKASSP----IV 424

上: *Pseudomonas stutzeri*下: *Bacillus subtilis*

【図 3】

RhI	MAEFR I AQDVVARENDRRASALKEDYEALGANLARRGVD I EAVTAKVEKFFVAVPSWVG	60
SISTR	MTE-----LA AVKAALKTQAVETPSWAYG	24
SITHE	MI-----NMER I FKELDELKFELPSWAFS	24
RhI	TGGTRFARFPGTGEPRGI EDKLDDCAVIQQLTRATPNVSLHIPWKA-DPKELKARGDAL	119
SISTR	NSGTRFKVFAQPGVPRDPFEKLDAAKVHEFTGAAPTVALHIPWDRVEDYAALAAHAEKR	84
SITHE	DAGTRFAVHEEGAARNVEERI EDAALVHRLTGCCPSVALHIPWDKVENWEELEFAEEK	84
RhI	GLGFDAMNSNTESDAPGQAHSYKYGSLSHTDAATRAQAVEHNLEQIEIGKAI GSKALTVW	179
SISTR	GVRIGAINSNTEQDD-----DYRLGSI CHPDAAVRRKAVDHLLEQVDIMDATGSRDLKLW	139
SITHE	GLKIGAINPNLEQDP-----DYKYGSLTNPSEKIRKKAIAHVMEQVDIAEKTGSKVISLW	139
RhI	IGDGSNFGQSNFTRAFERYLSAMAEIYKGLPDDWKLFSHKMYEPAFYSTVVQDWGTNY	239
SISTR	FADGTNYPGQDDIRSRQDRLEAGLAEVYERLGEGQRMILEYKLFEPAFYTTPDPDWGTAY	199
SITHE	LADGTDYRGQDDFRSRKKRLEESLRYIYENMPADMYLLIEYKFFEPAFYHTDIPDWGMSY	199
RhI	LIAQTEGPKAQCLVDLGHAPNTNIEMIVARLIQFGKLGGEHFNDISKYGDDDL DAGAIEP	299
SISTR	AHCLKLGEKAQVVVDTGHHAPGTNIEFIVATLLREGKLGGEFDNSRFYADDDLMVGAADP	259
SITHE	LLSEKLGERALVLDLGHIPGGTNI EYIVATLLSEKLGGEHLNRRKYADDDLTIASINP	259
RhI	YRLFVFNELVDAEARGVKGFH-----PAHMIQSHNVTDPTESLINSANEIRRAYAQALLV	356
SISTR	FQLERI-----MYEVVRGGGFTSD-----VAFMLDQCHNIEAKIPAIRSVMNVQEATAKALLV	313
SITHE	YEVELIFKEIVFAKRDPELSDSAKKVVLMDQAHITKPKILAMTQSVLIAQELFTKALLI	319
RhI	DRAALSGYQEDNDALMATETLKRAYRTDVEPI LAEARRRTGGAVDPVATYRASGYRARVA	416
SISTR	DGTALAEQAAGDVLEANAFLMDAYNTDVRPLIREVREESGLDPEPMKAYRSCGWAQKVV	373
SITHE	DENRLREAGKNYDVVEAEEILLDAFRTDVRPIIREYRRQKGLPEDPLRVFREEDYMEKRR	379
RhI	AERPASVAGGGGII	430
SISTR	AERIGGQQAGWG-A	386
SITHE	RERR-----	383

Identity

Streptomyces coelicolor 45%
Thermotoga maritima 39%

【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 新規かつ有用なL-ラムノースイソメラーゼ遺伝子の配列を提供し、遺伝子操作を利用した希少糖に生産や各種遺伝子工学的手法を用いた用途に利用できるようにすること。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。Pseudomonas stutzerii 由来のL-ラムノースイソメラーゼである上記のDNA。配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。上記のタンパク質を発現することができる発現系を含んでいる宿主細胞を培地に培養し、得られる培養物からL-ラムノースイソメラーゼ活性を有する組換えタンパク質を採取することを特徴とする組換えタンパク質の製造方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-096046
受付番号	50300534043
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成 15 年 4 月 4 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 3月31日

【特許出願人】

【識別番号】 593080401

【住所又は居所】 香川県高松市幸町1番1号

【氏名又は名称】 香川大学長

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102314

【住所又は居所】 東京都小金井市梶野町5-6-26

【氏名又は名称】 須藤 阿佐子

【代理人】

【識別番号】 100123984

【住所又は居所】 東京都小金井市梶野町5-6-26 須藤特許事務所

【氏名又は名称】 須藤 晃伸

次頁無

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-096046
受付番号	50300707437
書類名	手続補正書
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成15年 6月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 4月28日
【補正をする者】	
【識別番号】	593080401
【住所又は居所】	香川県高松市幸町1番1号
【氏名又は名称】	香川大学長
【代理人】	申請人
【識別番号】	100102314
【住所又は居所】	東京都小金井市梶野町5-6-26
【氏名又は名称】	須藤 阿佐子

次頁無

特願 2003-096046

出願人履歴情報

識別番号 [598112280]

1. 変更年月日 1998年 9月 1日
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消
[統合先識別番号] 593080401
住 所 香川県高松市幸町1-1
氏 名 香川大学長

出願人履歴情報

識別番号

[593080401]

1. 変更年月日 1998年 9月 1日
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合
[統合元識別番号] 598112280
住 所 香川県高松市幸町1番1号
氏 名 香川大学長

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.